

Abstract of DE 197 51 581 A1

The invention concerns a method of testing materials with respect to their antimicrobial efficiency. The method is carried out by example with a material containing silver.



① **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 51 581 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 51 581.9
㉑ Anmeldetag: 20. 11. 97
㉒ Offenlegungstag: 26. 8. 99

⑤ Int. Cl.⁶:
C 12 M 1/34
C 12 M 1/18
C 12 Q 1/18
G 01 N 33/535
G 01 N 33/543
G 01 N 21/17

DE 197 51 581 A 1

㉑ **Anmelder:**
Bechert, Thorsten, Dr., 96103 Hallstadt, DE;
Steinrücke, Peter, Dr., 07743 Jena, DE

㉒ **Vertreter:**
Maryniok und Kollegen, 96317 Kronach

㉓ **Erfinder:**
gleich Anmelder

⑥ **Entgegenhaltungen:**
DE 33 36 738 A1
DE 32 42 393 A1
US 41 11 754
EP 2 13 728 A1
WO 96 07 904 A1
JP 06-1 81 745 A (Abstract)
JP 07-1 23 999 A (Abstract)

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ **Verfahren zur Prüfung von Materialien hinsichtlich ihrer potentiellen antimikrobiellen Wirksamkeit und der Adhäsion auf ihrer Oberfläche**

⑥ Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Prüfung von Werkstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit sowie ein Verfahren zur Quantifizierung der Adhäsion von Antigenen auf Werkstoffen bereit. Außerdem wird eine Vorrichtung beschrieben, die die simultane Untersuchung einer großen Anzahl von Proben unter identischen Bedingungen ermöglicht.

DE 197 51 581 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von Wechselwirkungen zweier Substanzen bzw. Reaktionspartner. Insbesondere können Werkstoffe (z. B. Biomaterialien) bzw. Beschichtungsmaterialien auf antimikrobielle Wirksamkeit getestet und diese quantifiziert werden; außerdem kann die Adhäsion von lebenden Systemen, wie z. B. Mikroorganismen, und (bio)chemischen Substanzen auf Oberflächen, insbesondere den Oberflächen von Biomaterialien, quantifiziert werden. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung eine Vorrichtung, mit der eine große Anzahl von Proben simultan unter identischen Bedingungen untersucht werden können.

In der Forschung und Industrie werden permanent neu- und weiterentwickelte Biomaterialien und Werkstoffe auf den Markt gebracht. In der Medizin umfassen diese Biomaterialien den Bereich der Prothetik (Künstliche Gelenke, Klappen, Zahnersatz etc.) und der Intensivmedizin (Zu- und Abführleitungen, Katheter). Weitere generelle Industrieentwicklungen umfassen Bereiche wie biologische Abbaufähigkeit von Kunststoffen (Umwelttechnik), Widerstandskraft und Haltbarkeit der Werkstoffe, sowie deren biochemische Eigenschaften (Inertheit, Hydrophobizität, Biokompatibilität etc.). Durch Forschung und Entwicklung werden Werkstoffe neu kreiert und Oberflächen modifiziert, um die gewünschten Eigenschaften zu erhalten.

Bei der Prüfung von Werkstoffen und Biomaterialien sind besonders die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit der Werkstoffe/Biomaterialien einerseits und die Quantifizierung der Adhäsion von (bio)chemischen Substanzen und Zellen auf Werkstoffoberflächen andererseits zu nennen.

Die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit betrifft hauptsächlich das Gebiet der Medizin. Die Implantation von Biomaterialien ist ein Meilenstein der modernen Medizin. Für den Patienten werden durch Biomaterialien lebenserhaltende Aufgaben wahrgenommen. Gleichzeitig verbirgt sich bei der Anwendung eines der vordringlichsten Probleme in der Klinik: die fremdkörper-assoziierte Infektion, ausgelöst durch an sich harmlose Hautmikroorganismen, die das Implantat kolonisieren. In den USA werden jährlich allein bis zu 850 000 katheterassoziierte Infektionen festgestellt. Die Folgekosten von Katheterinfektionen werden mit 3000–6000 US-Dollar pro Fall beziffert. Neben dem klinischen Bereich findet die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit beispielsweise Verwendung in der Bier- und Weinindustrie. Auch bei Babywindeln, Kinderspielzeug, Küchen- und Bad/WC-Einrichtungen, Spülmitteln und Lotionen etc. ist ein Trend zu antimikrobiellen Materialien erkennbar, so daß auch auf diesen Gebieten ein wachsender Bedarf an Prüfungsmethoden für antimikrobielle Wirksamkeit besteht.

Die Entwicklung von Materialien mit antimikrobiellen Eigenschaften ist ein Schwerpunktthema für Forschung und Industrie und bietet durch die Verhinderung von Infektionen das Potential zur Rettung von Menschenleben und zu Einsparungen in Milliardenhöhe. Die Zahl eingeführter neuer Produkte mit antimikrobiellen Eigenschaften steigt stetig.

Die Quantifizierung der Adhäsion von lebenden Systemen und (bio)chemischen Substanzen auf Werkstoffoberflächen findet sich mit dem gleichen Stellenwert sowohl in der medizinischen Forschung und Entwicklung, als auch in der chemischen/biochemischen Industrie und Werkstoffwissenschaft.

Eine antimikrobielle Wirksamkeit (Aktivität) eines Werkstoffs oder einer Substanz kann grundsätzlich auf zwei, voneinander zu trennende, Eigenschaften des Materials zurückzuführen sein:

- entweder das Material läßt eine mikrobielle Besiedelung bzw. Anhaftung nicht zu, oder
- das Material entfaltet Eigenschaften, die zur Abtötung von Mikroorganismen führen, die das Material besiedeln haben.

Die Eigenschaft eines Stoffs, Mikroben abzutöten, muß in vitro in einem Versuchsmodell nachvollziehbar sein (Qualitätskontrolle oder "Screening"). Bei einem entsprechenden Test wird das Material zuerst mit Mikroorganismen besiedelt und anschließend das Wachstumsverhalten (Proliferation und Vitalität) der Mikroorganismen verfolgt.

Bei der Quantifizierung der Adhäsion von lebenden Systemen oder (bio)chemischen Substanzen wird die Probe mit dem zu untersuchenden Material inkubiert (in vitro), um das Adhäsionsverhalten (Affinität und Chemie der Wechselwirkung) studieren zu können.

Entsprechende Testverfahren sollen idealerweise folgenden Anforderungen genügen:

- Zur Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit sollten potentiell antimikrobielle Probe und Kontrolle (Probe ohne antimikrobielle Wirkung) unter simultanen Versuchsbedingungen gegenübergestellt werden können.
- Zur Quantifizierung der Adhäsion, können verschiedene Proben auf ihr Adhäsionsverhalten nur bei simultanen Versuchsbedingungen miteinander verglichen werden.
- Um eine aussagekräftige Statistik und Fehlerrechnung zu ermöglichen und aus Gründen der Ökonomie soll das Verfahren die gleichzeitige Prüfung einer hohen Anzahl von Proben (ca. 100 Proben) ermöglichen.
- Für vergleichende quantitative Aussagen muß sichergestellt sein, daß bei allen Proben eine definierte, gleichgroße Fläche gemessen wird.
- Das Verfahren soll schnell, reproduzierbar (d. h. mit minimalem statistischen Fehler) und kostengünstig sein.
- Das Verfahren soll in der Lage sein, geringste Unterschiede in den Aktivitäten verschiedener Proben zu erfassen, d. h. hoch sensitiv sein.
- Die Auswertung der Daten sollte durch ein EDV-gesteuertes automatisiertes Auswerteverfahren erfolgen.
- Das Wachstumsverhalten (Proliferation) der Mikroorganismen auf den Proben sollte zeitaufgelöst (online) z. B. durch Photometrie (d. h. Messung der optischen Dichte) auswertbar sein.
- Die Adhäsion (quantitativ) der (bio)chemischen Substanzen/Mikroorganismen auf den Proben sollte durch Photometrie (Messung der optischen Dichte) ausgewertet werden können.

Bis heute gibt es kein Verfahren, das die oben angesprochenen Anforderungen auch nur annähernd erfüllt. Die Verfahren, die bis zum heutigen Zeitpunkt in der Wissenschaft/Forschung und Entwicklung zur Prüfung von Biomaterialien Anwendung finden, sind nicht eindeutig definiert und mit großen Fehlern behaftet und daher wenig aussagekräftig; außerdem sind sie nicht ökonomisch.

Bekannt sind folgende Methoden:

Eine weltweit angewandte Methode ist der "Semi quantitative" Keimnachweis auf der Oberfläche von Biomaterialien durch Ausrolltechnik nach Maki (Maki D.G. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. In: Bisno A.L., Waldvogel F.A., eds. Infections associated with indwelling medical devices. Washington D.C.: Americal Society for Microbiology, (1994, 2nd ed.); und Maki D.G., C.E. Weise, H.W. Sarafin: A semiquantitative culture method for identi-

fyng intravenous catheter related infection. N. Engl J. Med. 296 (1977), 1305–1309). Dabei wird das zu prüfende Biomaterial unter möglichst sterilen Bedingungen manuell auf einer Agarplatte mit einer Pinzette hin- und hergerollt (eine Probe pro Agarplatte). Nach anschließender Bebrütung der Agarplatte kann über das bakterielle Wachstum "semiquantitativ" (durch zählen der Kolonien) die antimikrobielle Wirksamkeit oder Adhäsions-Eigenschaft des Biomaterials bestimmt werden.

Die Methode weist folgende Nachteile auf:

Die manuelle Durchführung ist nicht 100% reproduzierbar; außerdem bestehen keine simultanen Durchführungsbedingungen. Das Verfahren ist in höchstem Maß unökonomisch und mit einem hohen statistischen Fehler belegt. Des weiteren gibt es keine definierte Meßfläche. Trotz dieser gravierenden Nachteile ist die Methode nach Maki weltweit die am häufigsten eingesetzte. Ein weiteres Verfahren ist die Flush-Technik nach Cleri et al., (Cleri D.J., M.L. Corrado, und S.J. Seligman: Quantitative culture of intravenous catheters and other intravaskular inserts. J. Infect. Dis. 141 (1980), 781–786) bei der Biomaterialien (Schläuche) durchspült werden, das Eluat in verschiedenen Verdünnungsstufen (manuell) auf Agar-Platten plattiert und die Keimzahlen ausgezählt werden.

Die Methode weist die gleichen Nachteile auf wie die oben beschriebene von Maki.

Auch die Ultraschallbehandlung nach Sherertz (Sherertz R. J. et al., 1990: three-Year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. Jour. of clin. microbiology (1990), 76–82), bei der Bakterien auf der Oberfläche von Biomaterialien durch Ultraschall abgelöst (in Bouillon) und anschließend durch Ausplattieren die Anzahl der Keime bestimmt wird, findet Verwendung.

Abgesehen von unzureichenden Kenntnissen der Wirkungen von Ultraschall auf Mikroorganismen weist diese Methode ebenfalls die oben beschriebenen Nachteile auf.

Ebenfalls eingesetzt wird die radioaktive Markierung von Mikroorganismen zur Quantifizierung auf Biomaterialien. Neben den Nachteilen der Methode von Maki (s. o.) wirkt sich bei dieser Methode außerdem negativ aus, daß die Verwendung von Radioaktivität erhebliche Auflagen erfordert; außerdem kann eine Gefährdung der Gesundheit des Personals durch Radioaktivität nicht völlig ausgeschlossen werden.

Auch Hemmhofmessungen, bei denen die Zone der Inhibition mikrobiellen Wachstums gemessen wird, finden Verwendung (Raad I., R. Darouche, R. Hachem, M. Mansouri, G.P. Bodey: The broad-spectrum activity and efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin. J. Infec Dis. 173 (1996), 418–424; und Sampath L.A. et al., 1995: Infection resistance of surface modified catheters with either short-lived or prolonged activity. Jour. of hosp. infection (1995), 201–210). Diese Methode weist die gleichen Nachteile auf wie die Methode von Maki (s. o.). Die Hemmhofmessung ist zur Beurteilung der Besiedelbarkeit von Materialien nur eingeschränkt geeignet, weil die potentielle Aktivität unmittelbar auf der Oberfläche nicht erfaßt wird. Ein fehlender Hemmhof muß nicht zwangsläufig eine fehlende antimikrobielle Aktivität bedeuten. Auch die nicht-quantitative Analyse des Materials durch Inkubation in einer mikrobiellen Nährbouillon (trüb/klar) weist die oben angegebenen Nachteile auf.

Die beschriebenen Verfahren basieren auf Techniken der klassischen Mikrobiologie. Keines der Verfahren erfüllt jedoch die oben angesprochenen Anforderungen. Die Hauptangriffspunkte der aufgeführten Methoden sind die unzureichend beschriebene Reproduzierbarkeit, die unvollständige Fehlererfassung der Methode, und die fehlende simultane

Versuchsdurchführung. Überaus ungenügend ist in vielen Arbeiten die Beschreibung "semiquantitativ", womit die verwendete Methode sich selbst als unzureichend deklariert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem einerseits die antimikrobielle Wirksamkeit von gegebenenfalls vorbehandelten Werkstoffen, insbesondere Biomaterialien getestet werden kann und andererseits eine Quantifizierung der Adhäsion von Mikroorganismen und (bio)chemischen Substanzen auf Oberflächen möglich ist, wobei das Verfahren die oben genannten Anforderungen erfüllt.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung bereitzustellen, die es ermöglicht, die Prüfung so durchzuführen, daß eine große Anzahl von Proben unter identischen Bedingungen simultan untersucht werden können.

Diese Aufgabe wird durch die erfindungsgemäßen Verfahren bzw. die erfindungsgemäße Vorrichtung gelöst.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besteht aus 2 Teilen und ist dadurch gekennzeichnet, daß auf einem Teil eine Vielzahl von zu untersuchenden Werkstoffproben mit gleichen Abmessungen befestigt ist und das andere Teil mit einer Vielzahl von Vertiefungen gleicher Abmessung ausgestattet ist, wobei die Werkstoffproben so angeordnet sind, daß sie alle zentriert zu den Vertiefungen des zweiten Teils ausgerichtet sind und die Abmessungen der Proben an die Abmessungen der Vertiefungen angepaßt sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Prüfung von Werkstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit, umfaßt

- (a) Bereitstellung einer Werkstoffprobe definierter Geometrie und Größe
- (b) Inkubation der Probe mit einer Lösung, die den zu testenden Mikroorganismus enthält (Besiedelung der Probe mit dem Mikroorganismus),
- (c) Überführung der Probe in ein für den entsprechenden Mikroorganismus geeignetes Minimalmedium (Entfaltung der potentiellen antimikrobiellen Wirksamkeit),
- (d1) Überführung der Probe in eine für den Mikroorganismus geeignete Nährlösung (Nachweis des Ausmaßes der antimikrobiellen Wirksamkeit),
- (e1) Bestimmung der optischen Dichte der Nährlösung nach Entnahme der Probe (Endpunktmessung) oder
- (d2) Entnahme der Probe und Zugabe von 1 bis 1/2000 Volumenanteil Vollmedium zum Minimalmedium,
- (e2) zeitaufgelöste Bestimmung der optischen Dichte des Mediums (Kinetik).

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Quantifizierung der Adhäsion von Antigenen auf Werkstoffen, umfaßt:

- (a) Bereitstellen einer Werkstoffprobe definierter Geometrie und Größe
- (b) Inkubation der Probe mit einer Lösung, die den zu testenden Mikroorganismus enthält,
- (c) Überführung der Probe in eine Blockierungslösung
- (d) Überführung der Probe in eine Serumlösung
- (e) Überführung der Probe in eine Enzym-Konjugat-Lösung
- (f) Überführung der Probe in eine Enzym-Substrat-Lösung
- (g) Photometrische Vermessung der Enzym-Substrat-Lösung nach Entnahme der Probe.

Fig. 1 veranschaulicht die Verwendungsmöglichkeiten des "Mikroiterplatten-Kamms" bei den erfindungsgemäßen

Verfahren.

Fig. 1a zeigt eine 96-Loch-Mikrotiterplatte.

Fig. 1b zeigt den mit Proben bestückten Deckel einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ("Kamm").

Fig. 1c veranschaulicht die Verwendung des Deckels als Inkubationsgefäß.

Fig. 1d veranschaulicht die Verwendung des Deckels als Probenträger.

Fig. 1e zeigt die gemessene Fläche bei einer bevorzugten Ausführungsform.

Fig. 2 zeigt die bakterielle Proliferation, die bei der Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit gemäß Beispiel 1, nachvollzogen wird.

Fig. 3 zeigt die Ergebnisse von Beispiel 1 wie sie die Software des Mikrotiterplatten-Lesegeräts darstellt.

Fig. 4 zeigt die Quantifizierung der Adhäsion gemäß Beispiel 2 schematisch.

Fig. 5 zeigt die Ergebnisse von Beispiel 2, wie sie von der automatischen Auswertereinheit dargestellt werden.

Fig. 6 zeigt die Ergebnisse von Beispiel 3 (Prüfung von Windelstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit).

Fig. 7 zeigt die Ergebnisse von Beispiel 4 (Prüfung des Einflusses eines Tween-Coatings auf die Adhäsion von Bakterien).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Prüfung von Werkstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit können die verschiedensten Arten von Werkstoffen getestet werden; besonders interessant ist die Verwendung von Biomaterialien, d. h. Materialien, die in der Prothetik und Intensivmedizin eine Rolle spielen. Die Proben können z. B. in Form von Kunststoff-Schläuchen, Strängen, Borsten und Kügelchen vorliegen. Auch Stoffe und Papiere, wie z. B. Taschentücher, Babywindeln und Tücher für den Klinikbereich können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden. Wichtig für vergleichende Aussagen ist, daß die zu vergleichenden Proben alle die gleiche Geometrie und Größe aufweisen, damit Effekte, die auf unterschiedliche Geometrie und Größe zurückzuführen wären, ausgeschlossen werden können. Die zu untersuchenden Proben können auf antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber den unterschiedlichsten Bakterien, Pilzen und Hefen getestet werden. Wichtig im medizinischen Bereich ist z. B. die Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken.

Bei den erfindungsgemäßen zu untersuchenden Werkstoffproben kann es sich auch um vorbehandelte Werkstoffe handeln; unter Vorbehandlung wird z. B. auch eine Beschichtung mit Anstrichen oder Lacken aber auch mit Proteinen oder Detergenzien verstanden. Bei beschichteten Werkstoffen ist dann genaugenommen das Beschichtungsmaterial die zu untersuchende Probe. Auf diese Weise ist es z. B. möglich, auch Flüssigkeiten und Lotionen auf potentielle antimikrobielle Wirksamkeit zu testen. Der "Werkstoff" stellt dann nur einen Träger dar; wichtig ist dabei allerdings, daß eine gleichmäßige Beschichtung erreicht wird, bevor die Probe erfindungsgemäß getestet werden kann.

Entscheidend für das erfindungsgemäße Verfahren zur Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit ist die Inkubation mit einem Minimalmedium zur Entfaltung und zum Nachweis der potentiellen Aktivität. Das zu verwendende Minimalmedium hängt von dem verwendeten Mikroorganismus ab und kann individuell zusammengesetzt werden, sofern gewährleistet ist, daß das Medium ausreicht, um den Mikroorganismus am Leben zu erhalten aber die Zellteilungsrate stark reduziert ist. Die Inkubationszeit mit dem Minimalmedium kann beliebig variiert werden und z. B. im Bereich von 2 bis 50 Stunden liegen.

Danach wird die Probe in eine Nährlösung ("Vollmedium") überführt, die dann einen Proliferationsreiz für den

Mikroorganismus darstellt. Die Nährlösung richtet sich nach dem verwendeten Mikroorganismus und kann entweder der Fachliteratur entnommen oder im Labor individuell zusammengestellt werden. Bei der Proliferation werden vitale Zellen ins Medium entlassen, was zu einer Trübung führt. Diese Trübung (optische Dichte) kann photometrisch erfaßt werden: Je trüber das Medium ist, desto mehr vitale Zellen wurden abgegeben, d. h. desto geringer ist die antimikrobielle Wirksamkeit der geprüften Probe.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform wird die Probe aus dem Minimalmedium entfernt und 1 bis 1/100 Volumenanteil, bevorzugt 1 bis 1/10 Volumenanteil Vollmedium zum Minimalmedium zugegeben; danach erfolgt die zeitaufgelöste Bestimmung der optischen Dichte des Mediums (Kinetik). Die online entstehenden Wachstumskurven (EDV-überwacht) reflektieren das Ausmaß der antimikrobiellen Wirksamkeit.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine große Anzahl von Proben (bis 384) simultan untersucht werden, wenn Proben gleicher Geometrie und Größe in eine handelsübliche Mikrotiterplatte mit 96 bis 384 Vertiefungen oder eine entsprechende Vorrichtung eingebracht werden. Die Bestimmung der optischen Dichte kann mit einem kommerziellen EDV-gesteuerten Mikrotiterplatten-Lesegerät erfolgen.

Anstelle einer Endpunktmessung kann auch eine zeitaufgelöste on-line Messung erfolgen.

Durch Zugabe kleiner Mengen (1 bis 1/2000 Volumenanteil, bevorzugt 1/25 bis 1/1000 Volumenanteil) Vollmedium zum Minimalmedium kann die Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter gesteigert werden. Dadurch wird die Vitalität der Mikroorganismen so eingestellt, daß auch geringste antimikrobielle Aktivitäten der Probe nachweisbar sind.

Die vorliegende Erfindung stellt aber nicht nur ein Verfahren zur Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit von Werkstoffen bereit, sondern auch ein Verfahren zur Quantifizierung der Adhäsion von Antigenen, umfassend lebende Systeme und (bio)chemische Substanzen (z. B. Naturstoffe und synthetische Stoffe), auf Oberflächen. Mit diesem Verfahren können die gleichen Werkstoffe untersucht werden, wie vorne beschrieben. Auch hier ist es für Vergleiche zwischen verschiedenen Werkstoffen erforderlich, daß die Werkstoffproben alle eine definierte Geometrie und Größe haben. Die Verfahrensschritte dieses erfindungsgemäßen Verfahrens sind dem Fachmann von herkömmlichen ELISA-Tests geläufig. Wie beim herkömmlichen ELISA-Test erfolgt die Auswertung auch erfindungsgemäß z. B. mit einem Photometer. Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten als Reaktionsgefäße ist die Auswertung mit einem handelsüblichen Mikrotiterplatten-Lesegerät bevorzugt.

Abgesehen davon, daß beide Verfahren zur Werkstoffprüfung dienen, können beide Verfahren mit Hilfe der erfindungsgemäßen zweiteiligen Vorrichtung durchgeführt werden. Das Entscheidende der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Befestigung der Werkstoffproben an einem Teil der Vorrichtung ("Kamm"); die Proben sind dabei so angeordnet, daß sie alle zentriert zu den Vertiefungen des zweiten Vorrichtungsteils ausgerichtet sind und die Abmessungen der Proben an die Abmessungen der Vertiefungen angepaßt sind. Die Probenabmessungen sind dabei bevorzugt so gewählt, daß zwischen Probe und Boden der Vertiefungen ein Zwischenraum (z. B. im Falle einer Mikrotiterplatte 1–2 mm) verbleibt, wenn das mit den Proben bestückte Teil ("Kamm") auf dem mit Vertiefungen versehenen Teil aufliegt. Besonders bevorzugt ist es, wenn der Zwischenraum kleiner als die Hälfte der Tiefe der Vertiefungen ist. Das mit den Proben bestückte Teil wird im folgenden als Kamin be-

zeichnet. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Proben mit Hilfe von Klebstoff befestigt. Es ist auch möglich, die Proben auf bereits vorhandene Adapter aufzustücken.

Allerdings können die erfindungsgemäßen Verfahren auch mit losen Proben durchgeführt werden wie Beispiel 3 zeigt. Für die Anwendung werden die Proben manuell mit einer sterilen Pinzette von einem Reaktionsgefäß zum nächsten überführt.

Die einheitliche Geometrie der Proben ist vorzugsweise zylindrisch; jedoch sind auch andere Formen wie bananenförmig, birnenförmig oder quaderförmig möglich sofern alle Proben die gleiche Geometrie und Größe aufweisen. Der maximale Durchmesser der Proben ist vorzugsweise so groß wie die Hälfte des Durchmessers der Vertiefungen oder kleiner.

Wenn der Kamin in Form eines Deckels mit auf der Innenseite befestigten Probenstücken vorliegt, zeichnet er sich durch eine flexible Verwendungsweise aus: Einerseits kann er, auf dem Deckelrücken liegend, als Reaktionsgefäß benutzt werden; zum anderen dient er als Trägersystem für die Werkstoffproben, das es bei einer Folge von sequentiellen Reaktionsschritten erlaubt, alle Proben gleichzeitig von einer Lösung in eine andere zu überführen. Diese verschiedenen Verwendungsarten sind in Fig. 1c und d schematisch dargestellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem mit den Vertiefungen versehenen Teil der Vorrichtung um eine Mikrotiterplatte, bei dem Kamm handelt es sich dann um den zugehörigen Mikrotiterplattendeckel, auf dessen Innenseite die Proben befestigt sind.

Durch die verschiedenen Verwendungsmöglichkeiten des Kamms (Trägersystem gemäß Fig. 1d einerseits und Inkubationsgefäß gemäß Fig. 1c andererseits) ist es möglich, die Genauigkeit der erfindungsgemäßen Verfahren weiter zu erhöhen: Wird z. B. bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit die Inkubation mit der Mikroorganismen-Lösung und/oder die Inkubation im Minimalmedium so durchgeführt, daß der Kamm als Inkubationsgefäß (Fig. 1c) dient, so kommen die Proben 1, sofern sie über den Deckelrand hinausragen (siehe Fig. 1c), nur zum Teil mit der entsprechenden Lösung in Kontakt. Im Schritt (d) wird dann das mit Vertiefungen versehene "Gegenstück" des Kamms 4 als Inkubationsgefäß verwendet, und zwar wird der Flüssigkeitspegel dabei so gewählt, daß wieder nur ein Teilstück der Proben benetzt wird. Es gibt daher nur einen mittleren Bereich 5 des Probenstückes der mit allen Lösungen in Berührung gekommen ist (siehe Fig. 1e). Auf diese Weise wird dabei sichergestellt, daß die Messung nicht durch "Randeffekte" oder Artefakte verfälscht wird. Als "Randeffekte" sind denkbar: Beeinflussung der Mikroorganismen durch den verwendeten Klebstoff oder Effekte durch unterschiedliche Schnittkanten am freien Ende der Proben (diese könnten als Proliferationsreiz wirken und so das Ergebnis verfälschen). Auch Kapillareffekte z. B. bei Schlauchproben können mit diesem bevorzugten Verfahren vermieden werden.

Die beschriebene Arbeitsweise mit unterschiedlichem Einsatz des Kamms ist in analoger Weise auch bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Quantifizierung der Adhäsion auf gegebenenfalls vorbehandelten Oberflächen möglich; der Kamm wird dabei mindestens bei einem der Inkubationsschritte mit Mikroorganismen-Lösung, Blockierungslösung, Serumlösung und Enzym-Konjugat-Lösung als Inkubationsgefäß benutzt, während die Enzym-Substrat-Lösung oder Waschlösung in den Vertiefungen des Kamm-Gegenstücks bereitgestellt wird.

Es ist auch möglich eine Vorbehandlung der Proben (z. B.

Beschichtungen) mit dem Kamm-Modell durchzuführen. Zusätzlich kann der Kamm auch als Adapter dienen, auf dem flüssige Proben gebunden sind; dadurch können auch solche Proben geprüft werden.

Bei der vorliegenden Erfindung werden antimikrobielle Werkstoffe einer Kontrolle (Werkstoff ohne antimikrobielle Wirkung) unter simultanen Versuchsbedingungen gegenübergestellt. Durch die gleichzeitige Untersuchung einer hohen Anzahl von Proben (z. B. 96 Proben) ist eine aussagekräftige Statistik und Fehlerrechnung möglich und das Verfahren ist außerdem sehr ökonomisch.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich außerdem dadurch aus, daß bei allen Proben eine definierte gleichgroße Fläche gemessen wird, wodurch vergleichende quantitative Aussagen möglich sind.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß geringste Unterschiede in der Aktivität erfaßt werden können und das Verfahren damit hochsensitiv ist; außerdem liegt der statistische Fehler bei Adhäsionsbestimmungen und dem Test auf antimikrobielle Wirksamkeit über die zeit-aufgelöste Meßvariante bei < 15%.

Die Anwender-Freundlichkeit des bereitgestellten Verfahrens ist mit "sehr hoch" einzustufen. Die technischen Anforderungen (Geräte, Software, Laboratorien usw.) zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens gehören zur Grundausstattung von Forschungseinrichtungen und erfordern keine weiteren größeren Investitionen. So ist z. B. die 96-Loch Mikrotiterplatte mit Deckel, die als Probengefäß dient, seit mehr als 20 Jahren Industriestandard und die EDV-gesteuerte Analyse übernimmt ein herkömmliches Mikrotiterplatten-Lesegerät (gleichzeitig Photometer und "Plattenreader").

Zur Markierung der Adhäsion von Biomolekülen und Bakterien auf den zu untersuchenden Biomaterialien, können kommerzielle Antikörper verwendet werden.

Das Mikrotiterplatten-Kamm-Modell kann in allen Bereichen zur Anwendung gelangen, die sich mit der Entwicklung/Prüfung von Werkstoffen/Biomaterialien, auch von Arzneimitteln wie Salben und Lotionen und Oberflächenbeschichtungen in Form von Anstrichen, Lacken etc. oder Detergenzien befassen oder die die Wechselwirkung einer Matrix mit Mikroorganismen studieren (Adhäsion), z. B. in der Großindustrie, der Biomedizin und Pharmaindustrie, in mittelständischen Industrieunternehmen, der Lebensmittelindustrie, in Hochschulen, sowie in Forschungseinrichtungen für angewandte Forschung und Grundlagenforschung. Die erfindungsgemäßen Verfahren können bei der Produktentwicklung, -verbesserung und Qualitätskontrolle eingesetzt werden.

Außerdem ist die Einrichtung einer zentralen Prüfstelle, die die Prüfung und Charakterisierung von Proben in großem Maßstab übernimmt, denkbar.

Es ist denkbar, die erfindungsgemäße Vorrichtung auch für andere Untersuchungen einzusetzen, bei denen es nicht um die Adhäsion von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Viren und Hefen geht, sondern um die Untersuchung der Adhäsion von Naturstoffen wie Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden und Zuckern, eukaryontischen Zellen, Algen oder sonstiger Chemikalien. Insbesondere kann der Einfluß von Oberflächenbeschichtungen untersucht werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit von Biomaterialien (Beispiel 1) und die Quantifizierung der Adhäsion von Biomolekülen auf Werkstoffoberflächen (Beispiel 2) mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Kamm-Modells. Beispiel 3 erläutert die Prüfung von "losen Proben" (hier Windeln) auf antimikrobielle Wirksamkeit.

Beispiel 4 zeigt den Einfluß eines Detergenz-Coatings bei

einem Werkstoff auf die Adhäsion von Bakterien.

In der Klinik für Kinder und Jugendliche der Universität Erlangen-Nürnberg wird seit ca. 5 Jahren an der Entwicklung neuer Kathetermaterialien mit antimikrobieller Wirksamkeit gearbeitet (siehe oben zur Problematik der Katheterinfektionen). Durch Einbringung von Silber in das aus Polyurethan bestehende Kathetermaterial wurde ein neues antimikrobielles Biomaterial entwickelt. Mit dem Mikrotiterplatten-Kamm-Modell wurde der neue Katheter-Werkstoff auf antimikrobielle und antiadhäsive Eigenschaften geprüft und Kontrollkathetern gegenübergestellt (silberfreie kommerzielle Katheter).

Beispiel 1

Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Katheteroberflächen gegenüber *Staphylococcus epidermidis* (humane Bakterien)

Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Kammherstellung: 6 Proben "Kontrollkatheter" (Polyurethan ohne Silber) und 6 Proben "Silberkatheter" (Polyurethan mit eingebrachtem Silber) wurden so auf einen Deckel einer Mikrotiterplatte geklebt, daß die Proben genau in die Mitte der Vertiefungen der Mikrotiterplatte ragten. Die Proben waren zylinderförmig mit einer Länge von 1,1 cm und einem Durchmesser von 2 mm.
2. Füllen des Kamms mit 80 ml Bakterienlösung (10^8 logphase Zellen pro ml Vollmedium wurden 1 : 20 mit physiologischem Phosphatpuffer, pH 7.3 verdünnt)
3. Inkubation bei 37°C für 60 Minuten im Brutschrank (Besiedelung der Proben mit den Bakterien)
4. Absaugen der Bakterien und 4-maliges waschen des Kamms mit physiologischem Phosphat-Puffer pH 7,3
5. Setzen des Kamms in eine mit "Minimal-Medium" gefüllte Mikrotiterplatte (250 µl/Loch), Inkubation bei 37°C für 24 Stunden im Brutschrank zur Silbereinwirkung (Entfaltung einer potentiell antimikrobiellen Aktivität)
6. Nach mehrmaligem Waschen mit physiologischem Phosphat-Puffer pH 7,3 Überführung des Kamms in eine mit sterilem Bakterien-Vollmedium (Tryptase Soya Medium) gefüllten Mikrotiterplatte, Inkubation bei 37°C für 24 Stunden, Nachweis der bakteriellen Proliferation auf den Kathetern
7. Entnahme des Kamms, messen der Mikrotiterplatte (optische Dichte) im Photometer (Endpunktmessung bei 578 nm)

Als Minimal-Medium wurde kommerzieller physiologischer Phosphat-Puffer (PBS) mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 0,25% Glucose
- 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Zusatz von 1/100 Volumenanteil kommerzielles Tryptase-Soja-Vollmedium.

Es wurde gefunden, daß bei allen 6 Proben des Kontrollkatheters eine bakterielle Proliferation feststellbar war. Die optische Dichte lag zwischen 0,4 und 0,8 (Endpunktmessung gemessen bei 578 nm) Der Katheter zeigte keine antimikrobielle Wirksamkeit.

Dagegen war bei allen 6 Proben des Silberkatheters eine bakterielle Proliferation nicht zu erkennen. Die optische Dichte war 0,0. Der Katheter zeigte somit antibakterielle

rielle Wirksamkeit.

Fig. 2 erläutert schematisch die bakterielle Proliferation 6, wie sie im Mikrotiterplatten-Kamm-Modell nachvollzogen wird. Es ist ein Deckel einer Mikrotiterplatte 2 mit einer aufgeklebten Katheterprobe 1 sowie eine an das Medium abgegebene vitale Zelle 7 gezeigt.

Die Fig. 3 zeigt den Ausdruck der Ergebnisse von Beispiel 1, wie er vom EDV-gesteuerten Mikrotiterplatten-Lesegerät erhalten wird.

Beispiel 2

Quantifizierung der Adhäsion z. B. von Zellen auf Werkstoffoberflächen mit Hilfe eines ELISA-Tests

Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Kammherstellung: 6 Proben Kontrollkatheter, 6 Proben Silberkatheter (wie in Beispiel 1)
2. Füllen einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit der gleichen Bakterienlösung wie in Beispiel 1 (250 µl pro Loch)
3. Setzen des Kamms in die Platte und Inkubation bei 37°C für 60 Minuten im Brutschrank
4. Entnahme des Kamms und viermaliges Waschen mit PBS
5. Überführung des Kamms in eine mit Blockierungslösung (0,3% Magermilch in PBS-Puffer pH 7.3) gefüllten Mikrotiterplatte, Inkubation bei 22°C für 60 Minuten
6. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS Überführung des Kamms in eine mit Serum (Anti-Staphylokokken-Kaninchenserum, 1 : 1000 verdünnt mit Blockierungslösung) gefüllten Mikrotiterplatte, Inkubation bei 22°C für 120 Minuten
7. Mehrfaches Waschen des Kamms in Pufferlösung
8. Füllen des Kamms mit 80 ml einer sekundären Antikörper Lösung (kommerzielles Enzym-Konjugat, 1 : 2000 verdünnt mit Blockierungslösung), Inkubation bei 22°C für 120 Minuten
9. Vierfaches Waschen des Kamms in Pufferlösung
10. Setzen des Kamms in eine mit kommerziellem Enzym-Substrat gefüllten Mikrotiterplatte (230 µl pro Loch), Inkubation bei 22°C bis Verfärbung sichtbar wird
11. Entnahme des Kamms, Messen der Mikrotiterplatte im Photometer bei 405 nm.

Es wurde festgestellt, das der Silberkatheter im Vergleich zum silberfreien kommerziellen Kontrollkatheter eine 5-fach geringere Adhäsion von Bakterien am Material zeigte.

Die oben aufgeführten Arbeitsschritte entsprechen im Prinzip den in der Routine durchgeführten Arbeitsschritten bei immunologischen Reaktionen (ELISA-Tests).

Die von dem EDV-gesteuerten Mikrotiterplatten-Lesegerät erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 5 gezeigt. Fig. 4 erläutert schematisch die immunologischen Reaktionen zur Quantifizierung der Adhäsion von Bakterien auf dem Biomaterial im Mikrotiterplatten-Kamm-Modell; im einzelnen sind die auf dem Deckel der Mikrotiterplatte 2 befestigte Katheterprobe 1, ein daran haftendes Bakterium 8, sowie ein primärer 9 und ein sekundärer Antikörper 10, wie sie im ELISA-Test verwendet wurden, gezeigt.

Beispiel 3

Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit bei "losen" Proben (Windelstoffe für Säuglinge)

Es wurde eine potentiell antimikrobielle Windel (mit Silberimprägnierung) mit einer Kontroll-Windel (kein Silber) verglichen.

Von jeder Windel wurden 8 gleiche Stücke mit Ausmaßen von 10 mm x 3 mm abgeschnitten. Die Proben wurden mit einer sterilen Pinzette in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte eingebracht. Danach wurde die gleiche bakterielle Lösung wie in Beispiel 1 in die Vertiefungen pipettiert (280 µl je Loch).

Der weitere Versuchsablauf war wie in Beispiel 1 ausführlich beschrieben (Schritt 3-5) mit der Änderung, daß die Proben manuell von Titerplatte zu Titerplatte mit der Pinzette transportiert bzw. entnommen werden.

Nach Entnahme der Proben wurde 50 µl Trypcase-Soja-Medium zugegeben; es folgte eine zeitaufgelöste on-line Messung der bakteriellen Proliferation.

Das Ergebnis ist in Fig. 6 dargestellt; dabei ist die x-Achse die Zeitachse und auf der y-Achse wird die Zunahme der Bakterien dargestellt (Wachstumskurve, Messung der optischen Dichte).

Reihe 1 zeigt dabei die Ergebnisse einer 8-fach Messung des Kontrollstoffs (ohne Silber). Reihe 2 bezieht sich auf 8-fache Messung eines Stoffes mit 10 mg Ag-Imprägnierung. In Reihe 3 ist die 8-fach Messung eines Stoffes mit 50 mg Ag-Imprägnierung und in Reihe 4 eine 8-fach Messung ohne Stoff (Kontrolle des Mediums auf Sterilität) gezeigt. Reihe 5 stellt eine 2-Fach Messung des Mediums dar (Blank).

Fig. 6 zeigt Wachstumskurven von Staphylococcus epidermidis nach direktem Kontakt mit den Stoffproben. Der Nachweis der antimikrobiellen Wirkung wird durch die Analyse der Vitalität des Keims geführt. Auf den Proben ohne Silber wurde der Keim nicht abgetötet bzw. in der Vitalität herabgesetzt, es kommt in allen 8 Untersuchungen (Reihe 1) zu einem gleichmäßigen Wachstum (Proliferation). Bei der Verwendung von 10 mg Silber (Reihe 2) ist bereits deutlich eine antimikrobielle Wirkung erkennbar. In 3 Fällen (B2, E2, G2) ist der Keim vollständig abgetötet worden. Bei D2 und F2 ist die Vitalität sehr stark herabgesetzt, die Proliferation ist erheblich verzögert. C2 und H2 zeigen eine moderate Wirkung, die Proliferationsrate ist herabgesetzt. A2 zeigt keine Wirksamkeit. Das Spektrum der möglichen antibakteriellen Wirkung spiegelt sich in Reihe 2 wieder. Die Versuchsbedingungen sind so gewählt, daß die Messung hochsensitiv geringste Unterschiede in Reihe 2 erkennt. Die Schwankungsbreite in Reihe 2 liegt an der nicht gleichmäßigen Beschichtung der Proben mit Silber. Dieses Problem ist rein technisch und lösbar. Reihe 3 zeigt durch die Beschichtung von 50 mg Silber in allen 8 Messungen vollständige bakterizide Wirkung (Sterilität).

Beispiel 4

Prüfung der Adhäsion von Bakterien bei vorbehandelten Biomaterialien

Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Kammherstellung; je 8 Proben von 11 verschiedenen Kathetermaterialien, die sich im Ag-Gehalt unterscheiden, (Herstellung siehe Beispiel 1);
2. 44 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit Wasser gefüllt, 44 weitere Vertiefungen mit einer

0,1%igen Lösung von polyethoxyliertes Sorbitanmonolaurat (Tween® 20) in Wasser;

3. Setzen des Kamms in die Platte und zwar so, daß 4 Proben eines Kathetermaterials in Wasser inkubiert werden und 4 Proben des gleichen Materials in der Tween®-Lösung; Inkubation bei 22°C für 60 Minuten;
4. Entnahme des Kamms und waschen.

Die weiteren Schritte werden wie bei Beispiel 2 beschrieben (Schritte 2 bis 11) durchgeführt.

Fig. 7 zeigt graphisch die Ergebnisse, d. h. die Mittelwerte der jeweils 4 Proben gleichen Materials mit bzw. ohne Tween-Vorbehandlung (d. h. "Coating"). Bei allen 11 Materialien ist zu erkennen, daß bei Tween-coated Kathetern die bakterielle Adhäsion deutlich geringer ist als bei nicht-beschichteten Kathetern.

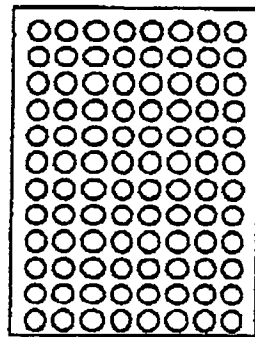
Patentsprüche

1. Vorrichtung bestehend aus 2 Teilen, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf einem Teil eine Vielzahl von zu untersuchenden Werkstoffproben mit gleichen Abmessungen befestigt ist und das andere Teil mit einer Vielzahl von Vertiefungen gleicher Abmessung ausgestattet ist, wobei die Werkstoffproben so angeordnet sind, daß sie alle zentriert zu den Vertiefungen des zweiten Teils ausgerichtet sind und die Abmessungen der Proben an die Abmessungen der Vertiefungen angepaßt sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Zwischenraum zwischen dem Boden der Vertiefungen und den Proben verbleibt, wenn das mit den Proben bestückte Teil auf dem mit Vertiefungen versehenen Teil aufliegt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei der Zwischenraum kleiner als die Hälfte der Tiefe der Vertiefungen ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proben zylinderförmig sind.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der maximale Querschnitt der Proben die Hälfte des Durchmessers der Vertiefungen oder weniger entspricht.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proben aufgeklebt sind.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei es sich bei dem mit Vertiefungen ausgestatteten Teil um eine Mikrotiterplatte und bei dem anderen Teil um einen dazu passenden Deckel handelt.
8. Verfahren zur Prüfung von Werkstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit, umfassend:
 - (a) Bereitstellung einer Probe definierter Geometrie und Größe,
 - (b) Inkubation der Probe mit einer Lösung, die den zu testenden Mikroorganismus enthält,
 - (c) Überführung der Probe in ein für den entsprechenden Mikroorganismus geeignetes Minimalmedium,
 - (d1) Überführung der Probe in eine für den Mikroorganismus geeignete Nährlösung,
 - (e1) Bestimmung der optischen Dichte der Nährlösung nach Entnahme der Probe, oder
 - (d2) Entnahme der Probe und Zugabe von 1 bis 1/100 Volumenanteil Vollmedium zum Minimalmedium,
 - (e2) zeitaufgelöste Bestimmung der optischen Dichte des Mediums.

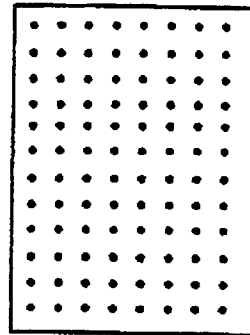
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei dem Minimalmedium in Schritt (c) 1 bis 1/2000 Volumenanteil Vollmedium zugegeben wird.
10. Verfahren zur Quantifizierung der Adhäsion von Antigenen auf Werkstoffen, umfassend: 5
- (a) Bereitstellen einer Probe definierter Geometrie und Größe
 - (b) Inkubation der Probe mit einer Lösung, die das zu testende Antigen enthält,
 - (c) Überführung der Probe in eine Blockierungslösung 10
 - (d) Überführung der Probe in eine Serumlösung
 - (e) Überführung der Probe in eine Enzym-Konjugat-Lösung
 - (f) Überführung der Probe in eine Enzym-Substrat-Lösung 15
 - (g) Photometrische Vermessung der Enzym-Substratlösung nach Entnahme der Probe.
11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 10, wobei eine Vielzahl von Proben gleicher Geometrie und Größe simultan in einer Mikrotiterplatte geprüft werden. 20
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Auswertung mit einem EDV-gesteuerten Mikrotiterplatten-Lesegerät erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, wobei die Proben in Form eines Trägersystems wie in einem der Ansprüche 1 bis 7 definiert, bereitgestellt werden. 25
14. Verfahren nach Anspruch 8 und 13, wobei eine Vorrichtung nach Anspruch 7 verwendet wird und der mit Proben bestückte Deckel bei Schritt (b) und/oder (c) als Inkubationsgefäß dient. 30
15. Verfahren nach Anspruch 10 und 13, wobei eine Vorrichtung nach Anspruch 7 verwendet wird und mindestens bei einem der Schritte (b) bis (e) der mit den Proben bestückte Deckel als Inkubationsgefäß dient. 35
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, wobei es sich bei den Werkstoffen um Biomaterial handelt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 16, wobei der Werkstoff vorbehandelt wurde. 40
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei es sich bei dem vorbehandelten Werkstoff um einen beschichteten Werkstoff handelt.
19. Verwendung von ELISA-Tests zur Quantifizierung der Adhäsion von Antigenen auf gegebenenfalls vorbehandelten Werkstoffproben. 45
20. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Prüfung von gegebenenfalls vorbehandelten Werkstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit. 50
21. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bei der Quantifizierung der Adhäsion auf gegebenenfalls vorbehandelten Werkstoffoberflächen. 55

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



1a



1b

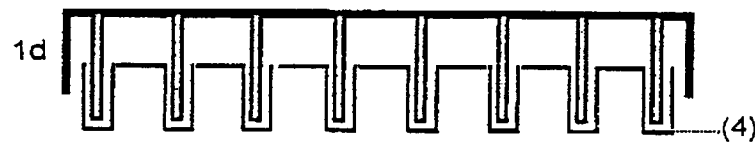
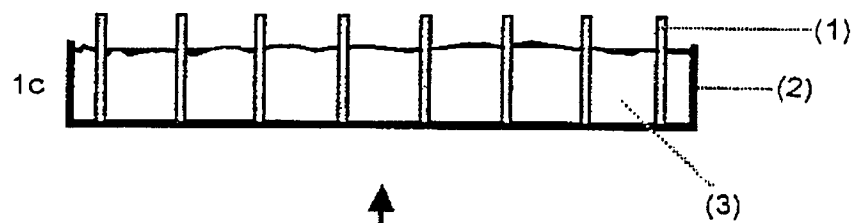


Fig. 1

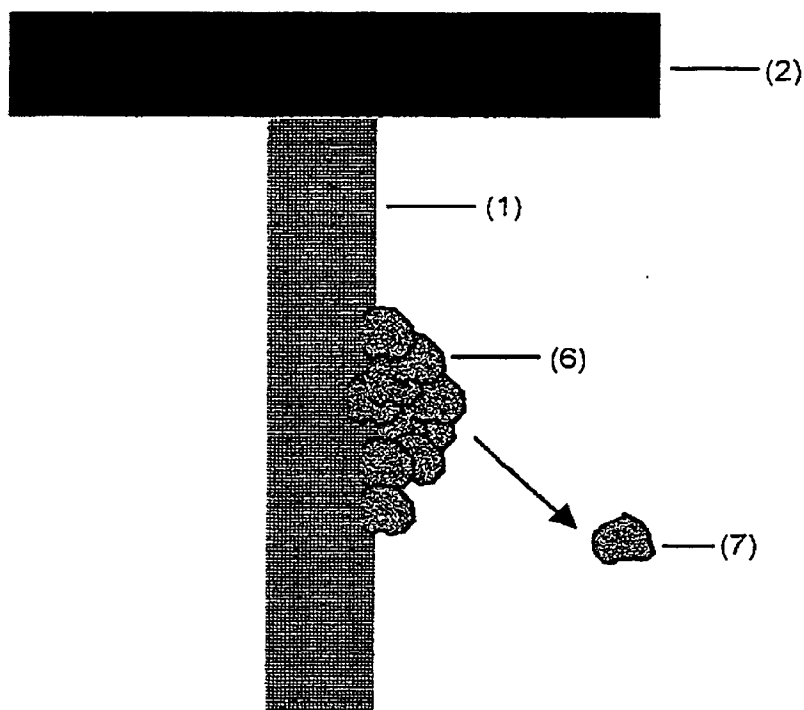


Fig. 2

96-Loch Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.002			0.495		-0.002						
B	0.002			0.760		0.000						
C				0.590		0.001						
D				0.496		-0.002						
E				0.437		-0.001						
F				0.443		-0.004						
G												
H												

Formula: L1

Data Mode: Absorbance

Plate Blank Used L1 = 0.064

Silberkatheter

Sample	Wells	Values	MeanValue	Std.Dev.
S1101	A6	-0.002	-0.001	0.002
	B6	0.000		
	C6	0.001		
	D6	-0.002		
	E6	-0.001		
	F6	-0.004		

Smallest standard value: -0.001

Largest standard value: -0.001

komm. Katheter

Sample	Wells	Values	MeanValue	Std.Dev.
ko01	A4	0.495	0.537	0.122
	B4	0.760		
	C4	0.590		
	D4	0.496		
	E4	0.437		
	F4	0.443		

Smallest standard value: 0.537

Largest standard value: 0.537

Fig. 3

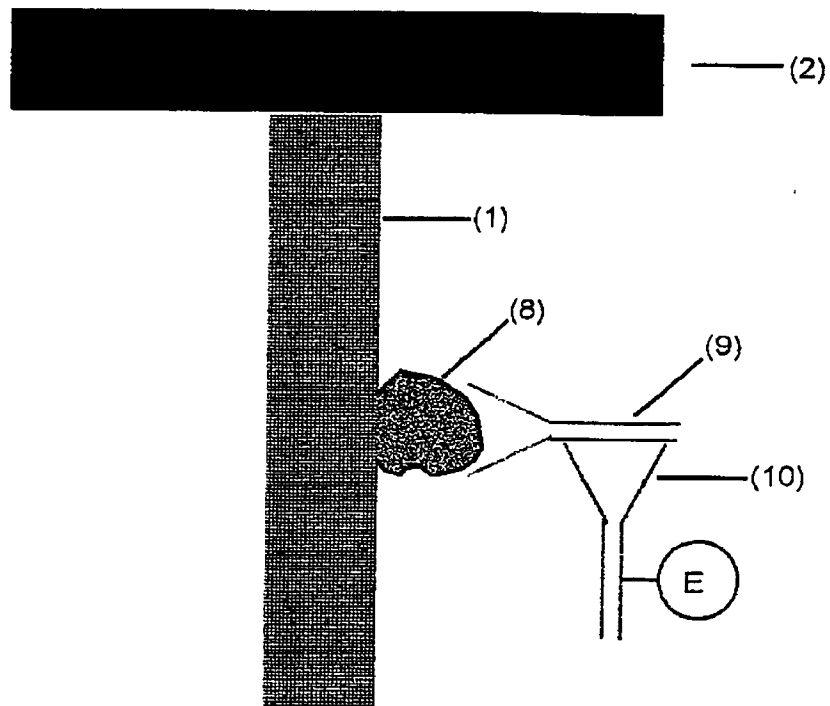


Fig. 4

96-Loch Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.001					0.652		0.106		
B	-0.001					0.486		0.094		
C						0.508		0.081		
D						0.519		0.081		
E						0.608		0.110		
F						0.409		0.095		
G										
H										

Formula: L1

Data Mode: Absorbance

Plate Blank Used L1 = 0.065

Silberkatheter

Sample	Wells	Values	MeanValue	Std.Dev.
9e01	A8	0.106	0.094	0.012
	B8	0.094		
	C8	0.081		
	D8	0.081		
	E8	0.110		
	F8	0.095		

Smallest standard value: 0.094

Largest standard value: 0.094

Komm. Katheter

Sample	Wells	Values	MeanValue	Std.Dev.
arr01	A6	0.652	0.530	0.087
	B6	0.486		
	C6	0.508		
	D6	0.519		
	E6	0.608		
	F6	0.409		

Smallest standard value: 0.530

Largest standard value: 0.530

Fig. 5

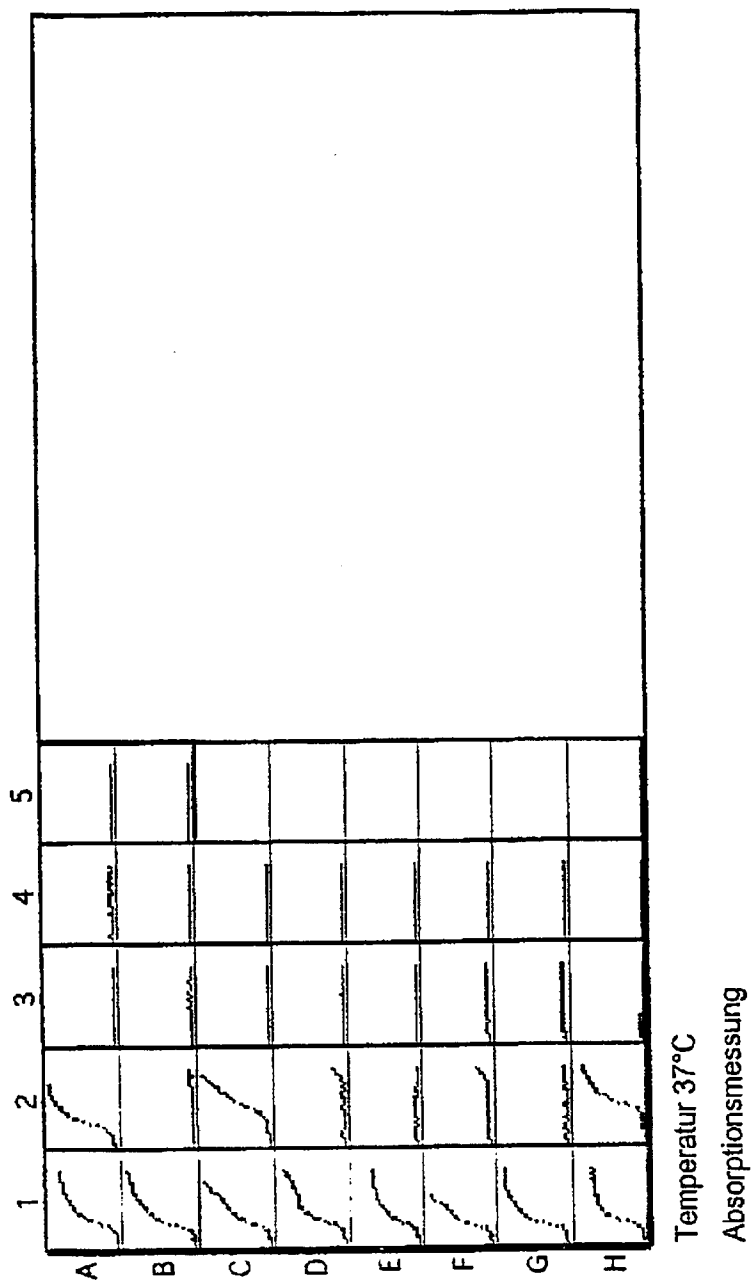


Fig. 6

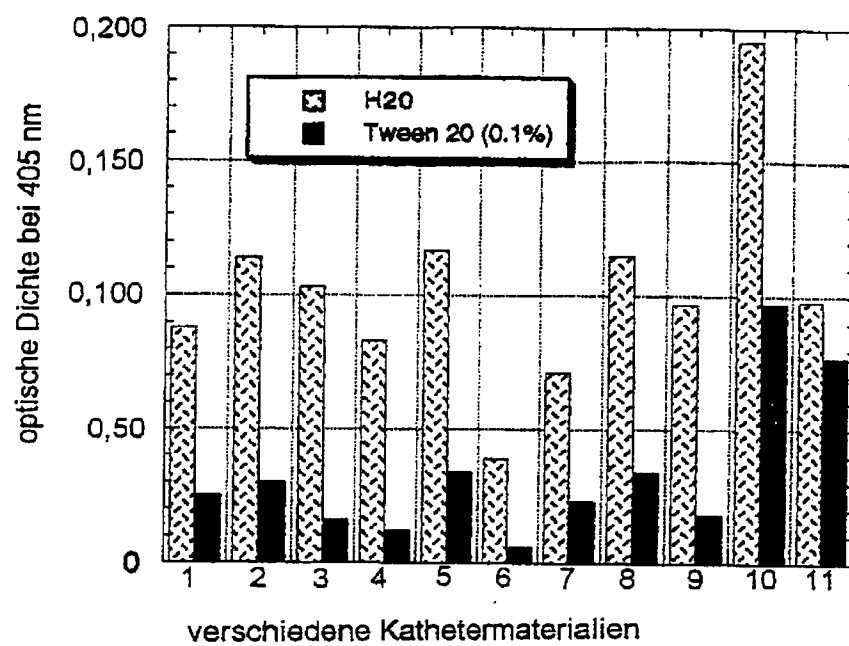


Fig. 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.